



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Marília Ceolin Camargo

**ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DE JUÇARA:
COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO
CONVENCIONAL E SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO**

Orientadora: Profa. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga

Diadema

2018

Marília Ceolin Camargo

**ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DE JUÇARA: COMPARAÇÃO ENTRE
OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL E SISTEMA AQUOSO
BIFÁSICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química, ao Instituto de
Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade
Federal de São Paulo – Campus
Diadema.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Rafaela
Cavalcante Braga

DIADEMA

2018

CAMARGO, Marília Ceolin

Estabilidade das antocianinas de juçara: Comparação entre os métodos de extração convencional e sistema aquoso bifásico/ Marília Ceolin Camargo -- Diadema, SP, 2018.

34 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química)

Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2018.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga.

1.Antocianinas. 2.Pigmento Natural. 3.Extração. 4.Quantificação. 5. Sistema Aquoso Bifásico. 6. Estabilidade Térmica

CDD 543.8

MARILIA CEOLIN CAMARGO

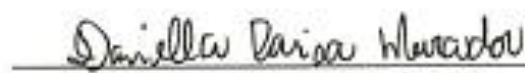
**ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DE JUÇARA:
COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO
CONVENCIONAL E SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química, ao
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade Federal de São
Paulo – Campus Diadema.

Aprovado em: 04/12/2018

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Anna Rafaela Cavalcante Braga


MSc. Daniella Carisa Murador


Prof.^a Sergiana Ramos

Diadema (SP)
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Anna Rafaela por ser uma inspiração e um exemplo a seguir, pelo apoio, ensinamentos, confiança e dedicação ao longo de todo o trabalho.

Aos meus pais por me incentivarem a ser uma pessoa melhor, que abdicaram de muitas coisas em função de meu desenvolvimento. Ao Bruno por ser um modelo e ao Cauã por tornar tudo mais completo. Ao Augusto por me acompanhar nos momentos mais difíceis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização do meu trabalho e formação. A UNIFESP por possibilitar a realização dos meus sonhos.

Resumo

As antocianinas são polifenóis, pertencentes a classe dos flavonoides, encontrados em plantas superiores, capazes de promover a saúde humana, no entanto, os efeitos das antocianinas em nossa saúde dependem da quantidade consumida e da sua biodisponibilidade. Muitas pesquisas demonstram o potencial antioxidante das antocianinas, além de sua capacidade em combater doenças crônicas neurodegenerativas, cardiovasculares e diabetes. Além das antocianinas serem benéficas a saúde, as mesmas também podem ser empregadas na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia como corantes naturais, e na prevenção contra a auto oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos, entretanto a sua utilização nas indústrias ainda é restrita devido à sua baixa estabilidade. Sabe-se que as antocianinas são moléculas muito instáveis físico-quimicamente, e que alguns fatores como a luz, pH, temperatura, presença de oxigênio e de outros íons e moléculas podem causar a sua degradação, além do mais os processos de extração, manipulação, recuperação, purificação e armazenamento também podem influenciar na sua degradação. O estudo da estabilidade térmica das antocianinas obtidas por métodos não convencionais faz-se necessário, a fim de obter métodos mais eficientes e com custo inferior as obtidas pelos métodos convencionais. A polpa dos frutos da palmeira *Euterpe edulis* Mart., conhecida como juçara, foi escolhida como fonte de antocianinas no desenvolvimento deste estudo, o qual visa comparar a estabilidade térmica das antocianinas extraídas por um método convencional, no qual foi utilizado metanol acidificado, em contraposição ao sistema aquoso bifásico (SAB), em que se empregou polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio. A partir da análise de degradação térmica foi evidenciado que a estabilidade das antocianinas extraídas utilizando o SAB foi superior, considerando os parâmetros avaliados no presente estudo. A energia térmica de desnaturação e a meia vida, tal como o teor de antocianinas extraídas excedeu àquelas alcançadas pelo método convencional, por conseguinte, o sistema aquoso bifásico apresentou-se como uma excelente alternativa para a extração desse pigmento.

Palavras-chave: antocianinas; degradação; juçara; método não convencional; estabilidade.

Abstract

Anthocyanins are polyphenols, which are part of the flavonoid class, are contained in superior plants and capable of promoting human health, however, the effects of anthocyanins on our health depend on the amount consumed and its bioavailability. Many researches demonstrate the antioxidant potential of anthocyanins, as well as their ability to combat chronic neurodegenerative, cardiovascular, and diabetes diseases. Besides anthocyanins are beneficial to health, they can also be used in the cosmetics, pharmaceutical and food industries as natural dyes, and in the prevention against auto oxidation and lipid peroxidation in biological systems, however their use in industries is still restricted due to its low stability. It is known that anthocyanins are molecules very unstable physiochemically, and that some factors such as light, pH, temperature, presence of oxygen and other ions and molecules can cause its degradation, in addition the processes of extraction, manipulation, recovery, purification and storage may also influence its degradation. The study of the thermal stability of anthocyanins obtained by non-conventional methods is necessary in order to obtain more efficient and cost-effective methods than those obtained by conventional methods. The pulp of the fruits of the palm *Euterpe edulis* Mart., Known as jussara, was chosen as source of anthocyanins in the development of this study, which aims to compare the thermal stability of anthocyanins extracted by a conventional method, in which acidified methanol was used to the biphasic aqueous system (SAB) in which polyethylene glycol (PEG) / potassium phosphate was used. From the analysis of thermal degradation, it was evidenced that the stability of the anthocyanins extracted using the SAB was superior, considering the parameters evaluated in the present study. The thermal energy of denaturation and the half-life as the content of extracted anthocyanins exceeded those reached by the conventional method, therefore, the biphasic aqueous system presented as an excellent alternative for the extraction of this pigment.

Keywords: anthocyanins; degradation; jussara; unconventional method; stability.

Lista de tabelas:

Tabela 1: Tipos de sistemas aquosos bifásicos.....	20
Tabela 2: Dados experimentais para o sistema convencional (metanol acidificado).....	26
Tabela 3: Dados experimentais SAB (PEG/fosfato de potássio).	27
Tabela 4: Resultados dos parâmetros de degradação térmica para o método convencional (metanol acidificado) e SAB (PEG/fosfato de potássio).	29

Lista de figuras:

Figura 1: Estrutura das principais subclasses de flavonoides.....	12
Figura 2: Cátion flavílio, estrutura básica das antocianinas, diferem apenas nos grupamentos R.	14
Figura 3: Espectros da antocianina cianidina 3-ramnosilglicosídeo em soluções tampão de diferentes pHs. A concentração constante do pigmento: $1,6 \times 10^{-2}$ g/L.....	15
Figura 4: Juçara e seus produtos e sua relação com o ecossistema e a sociedade.....	17
Figura 5: Palmeira de juçara e seus frutos.....	18
Figura 6: Representação do sistema aquoso bifásico.	20
Figura 7: Representação de um diagrama de fases do sistema aquoso bifásico.....	21
Figura 8: Determinação do K_d a partir da regressão dos dados experimentais em relação ao t (s) para o sistema convencional (metanol acidificado).	27
Figura 9: Determinação do K_d a partir da regressão dos dados experimentais em relação ao t (s) para o sistema aquoso bifásico - SAB (PEG/fosfato de potássio).....	28
Figura 10: Linearização equação de Arrhenius para obtenção de E_d e A;.....	29

Sumário:

1.	Introdução	10
2.	Objetivo	11
3.	Revisão Bibliográfica	11
3.1	Flavonoides ou bioflavonoides	11
3.2	Antocianinas	12
3.3	Estabilidade das Antocianinas	14
3.4	Juçara (<i>Euterpe edulis Mart.</i>)	16
3.5	Extração das antocianinas.....	18
4.	Material e Métodos	22
4.1	Amostras	22
4.2	Extração de antocianinas pelo método convencional	22
4.3	Extração de antocianinas utilizando sistema aquoso bifásico (SAB).....	22
4.4	Estudo da estabilidade térmica das antocianinas	22
5.	Resultados e Discussão	26
6.	Conclusões	30
7.	Referências.....	31

1. Introdução

O valor nutricional e as propriedades benéficas à saúde são os principais fatores que conduzem o interesse crescente no consumo de frutas, legumes e verduras, que apresentam compostos bioativos como compostos fenólicos, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico, entre outros. Estes compostos atuam no combate às espécies reativas de oxigênio, estimulando o sistema imunológico, regulando a expressão gênica para a proliferação ou apoptose de células, modulando o metabolismo de hormônios e atividades antibacteriana e antiviral. Essas ações no organismo humano refletem na redução da incidência de câncer, inflamações, cataratas, degeneração macular e de doenças cardiovasculares (BRAGA *et al.*, 2018).

Dentre os compostos bioativos, destacam-se as antocianinas, que são pigmentos naturais encontrados nas matrizes de plantas superiores, incessantemente despertam o interesse de diversas indústrias e pesquisadores, visto que além de serem uma alternativa aos corantes sintéticos, também são capazes de beneficiar a saúde humana (BASHARAT, *et al.*, 2016; PENNINGTON, 2009). No entanto, são instáveis a fatores como temperatura e pH, são fotossensíveis e facilmente degradáveis, por consequência são complicadas de serem extraídas, processadas e conservadas (BASHARAT, *et al.*, 2016; ROSSI, *et al.*, 2011; PENNINGTON, 2009).

O aumento da estabilidade e biodisponibilidade das antocianinas representa um grande desafio para sua utilização industrial como pigmento natural (BRAGA *et al.*, 2018). Para garantir maior estabilidade dos extratos antocianínicos e potencializar a quantidade de pigmentos extraídos de uma matriz, faz-se necessário desenvolver métodos mais eficientes de extração, o que implica em otimizar as diversas etapas de obtenção das antocianinas bem como, garantir que o extrato possua estabilidade térmica adequada para determinada finalidade. Como muitos processos acabam por degradar e/ou inativar as antocianinas, o custo de comercialização dessas moléculas isoladas e com alto grau de pureza acaba sendo elevado. A síntese artificial destes compostos também é extremamente cara e complexa (ROSSI, *et al.*, 2011). Portanto, é indispensável a ampliação da obtenção destes compostos de forma viável e sustentável sem que haja perda de sua integridade (MARTÍN, *et al.*, 2018; ROSSI, *et al.*, 2011).

Segundo o estudo de BRITO *et al.* (2007) os frutos da palmeira de juçara (*Euterpe edulis Mart.*), possuem elevada quantidade de antocianinas, com destaque para as moléculas cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo com teores de 1358 mg/100g (bs – base seca) e 1565 mg/100g (bs), respectivamente. O fruto da juçara foi escolhido no desenvolvimento deste estudo, que visa comparar a estabilidade térmica das antocianinas obtidas por um método convencional, em contraste ao sistema aquoso bifásico – SAB.

2. Objetivo

Este trabalho de conclusão de curso, possui como objetivo comparar a estabilidade térmica das antocianinas obtidas pela polpa de juçara (*Euterpe edulis Mart.*) extraídas pelo método convencional (metanol acidificado) e pelo sistema aquoso bifásico (polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio).

3. Revisão Bibliográfica

Nesta seção serão abordados aspectos a respeito das antocianinas, moléculas pertencentes a classe dos flavonoides e conceitos acerca dos solventes utilizados para sua extração.

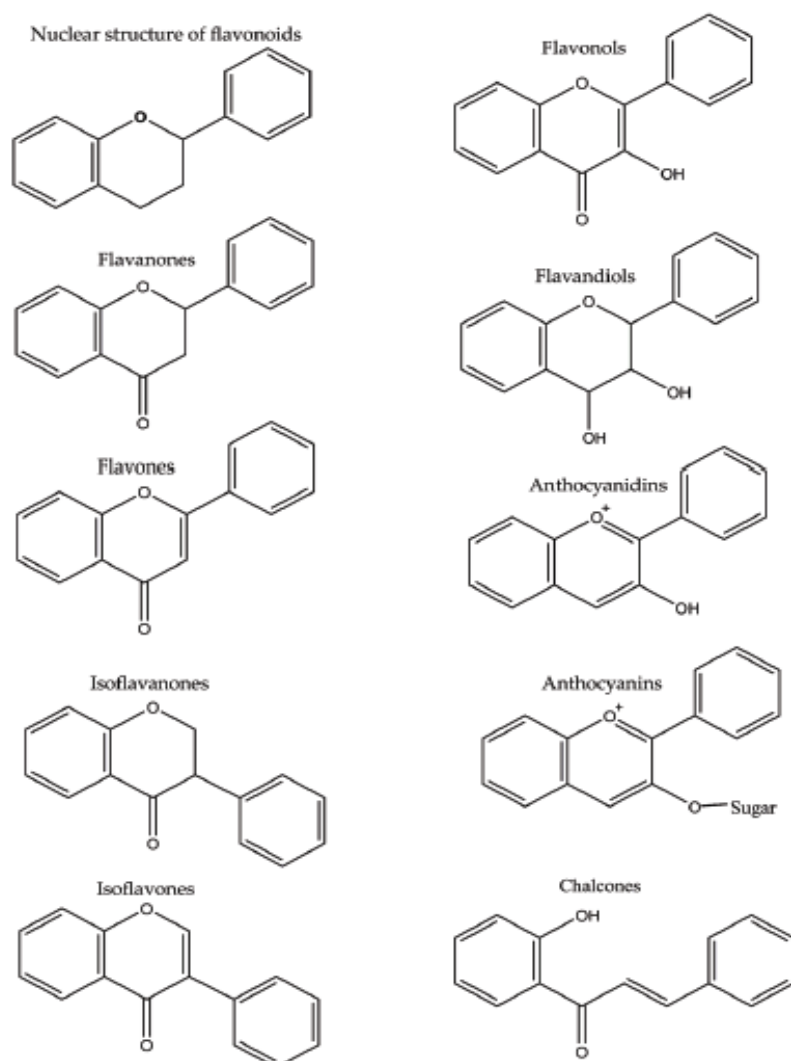
3.1 Flavonoides ou bioflavonoides

Os flavonoides são moléculas orgânicas de origem vegetal, são considerados fitonutrientes, que promovem a saúde humana, e não podem ser sintetizados pelo organismo humano (INAURY, 2016). A importância desse grupo de compostos está agregada ao seu potencial medicinal, muitas indústrias e pesquisadores têm demonstrado grande interesse, além da sua alta capacidade antioxidante, ainda possuem ação anti-inflamatória, antialérgica, anti-hemorrágica e são capazes de prevenir e curar muitas doenças (INAURY, 2016; YAO, *et al.*, 2004).

Os flavonoides pertencem a classe de compostos poli fenólicos orgânicos e são encontrados em diferentes concentrações especialmente em frutos, mas também em vegetais, grãos e sementes (BELL, *et al.*, 2015). Os flavonoides podem ser achados na matriz vegetal tanto em suas formas livres (agliconas) ou conjugados com moléculas de açúcar (glicosídeos), mais de 4500 diferentes flavonoides foram identificados e podem ser divididos em diferentes subclasses, as mais comuns são flavonóis, antocianinas, flavanas, flavonas, flavononas e isoflavonóides, a variedade de flavonoides está ligada a posição do anel aromático, a Figura 1 apresenta a estrutura das subclasses mais comuns (TENANGO, *et al.*, 2017; FERREYRA, *et al.*, 2012).

Dentre os flavonoides, as antocianinas tem despertado um grande interesse nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica. O interesse no uso de antocianinas como pigmentos naturais com alto valor agregado alternativamente aos pigmentos sintéticos tem aumentado nos últimos anos, especialmente devido ao reconhecimento do potencial adverso para a saúde oriundos dos efeitos do consumo de corantes sintéticos (HE & GIUSTI, 2011).

Figura 1: Estrutura das principais subclasses de flavonoides.



Fonte: (TENANGO, *et al.*, 2017)

3.2 Antocianinas

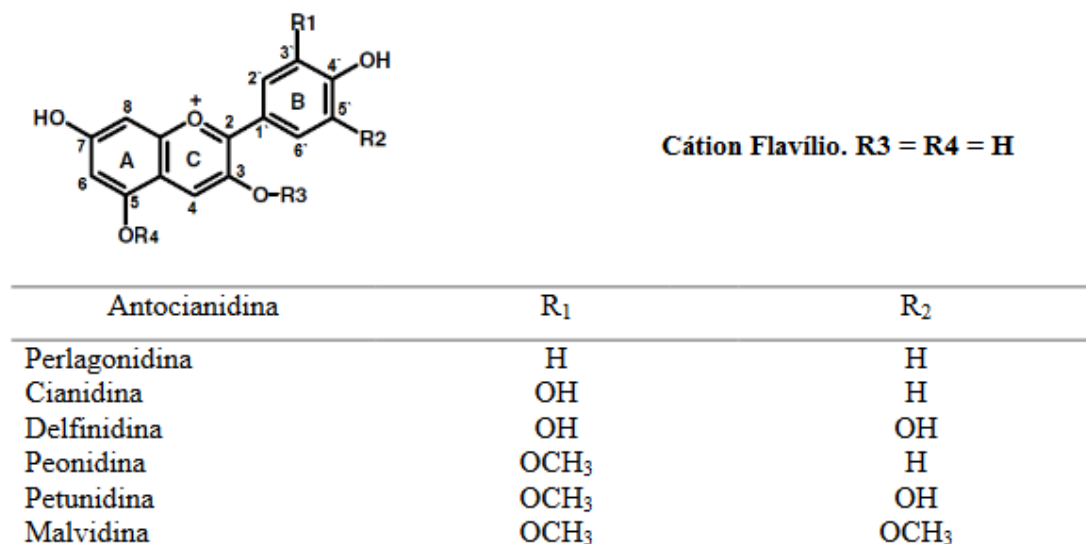
As antocianinas pertencem a classe dos flavonoides, são pigmentos naturais púrpuros, azuis e vermelhos encontrados em frutos, flores, caules, sementes e até em raízes de plantas superiores, são muito importantes na atração de polinizadores, na absorção de raios ultravioleta e até mesmo para a proteção contra a herbivoria e patógenos das plantas (JUDD, *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstram que plantas em situação de estresse hídrico, mecânico e ambiental ou mesmo por deficiência nutritiva, podem aumentar a produção de antocianinas afim de aumentar a resposta antioxidante da planta (FAMAGUSTA & GAZI UNIVERSITY ANKARA TURKEY, 2012).

A utilização de corantes na indústria alimentícia é uma prática frequente, pois a cor e a aparência são essenciais na aceitação dos produtos pelo consumidor, sabe-se que o processamento e armazenamento de alimentos, muitas vezes acarreta em modificações de coloração, as quais devem ser recondicionadas com a utilização de pigmentos (LOPES, *et al.*, 2007). Devido a ações legislativas que restringem a utilização de corantes sintéticos e a reivindicação do consumidor por alimentos de maior qualidade, o interesse em pigmentos naturais se intensificou (LOPES, *et al.*, 2007). As antocianinas mostraram-se uma boa alternativa devido as suas propriedades coloríficas, mas também devido à crescente evidência de beneficiarem à saúde humana. Esses pigmentos além de utilizados industrialmente como corante natural em alimentos, tecido e cosmetologia, possuem elevada capacidade antioxidante (FAMAGUSTA & GAZI UNIVERSITY ANKARA TURKEY, 2012). Alguns estudos demonstram os benefícios das antocianinas no bom funcionamento da visão e do sistema cardiovascular, na prevenção de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, diabetes e inflamações, bem como as suas propriedades anticancerígenas e antivirais (MCANULTY, *et al.*, 2017; BASHARAT, *et al.*, 2016; FAMAGUSTA & GAZI UNIVERSITY ANKARA TURKEY, 2012; PENNINGTON, 2009).

A estrutura básica das antocianinas é composta por uma aglicona estereificada com um ou mais açúcares, os quais possuem habilidade de estabilizar a molécula (FAMAGUSTA & GAZI UNIVERSITY ANKARA TURKEY, 2012). As antocianinas diferem na quantidade de grupos hidroxila e radicais metoxi, no número e nos sítios de ligação de açúcares, bem como nos tipos e na quantidade de ácidos aromáticos ou alifáticos ligados ao açúcar da molécula. Existem diversos tipos de antocianinas e sua cor decorre da quantidade e do tipo dos substituintes ligados à molécula. A Figura 2 apresenta a estrutura básica bem como os radicais das agliconas mais comuns em vegetais. (FAMAGUSTA & GAZI UNIVERSITY ANKARA TURKEY, 2012; DAMODARAN, *et al.*, 2010; YAO, *et al.*, 2004).

Devido a possibilidade de diversos substituintes ligados as agliconas, há mais de 600 tipos de antocianinas já descobertas em plantas superiores, e muitas ainda continuam sendo isoladas. Sua concentração em vegetais está relacionada com a maturidade da planta e até mesmo com a forma de cultivo (DAMODARAN, *et al.*, 2010). A inserção de antocianinas em alimentos, cosméticos e produtos médicos é uma tarefa desafiadora devido à baixa estabilidade destes pigmentos em certas condições de processamento e armazenamento, o tópico 3.3 abordará de forma mais profunda esta característica acerca das antocianinas (YOUSUF, *et al.*, 2016)

Figura 2: Cátion flavílio, estrutura básica das antocianinas, diferem apenas nos grupamentos R.



Fonte: Adaptado de (DAMODARAN, *et.al.*, 2010)

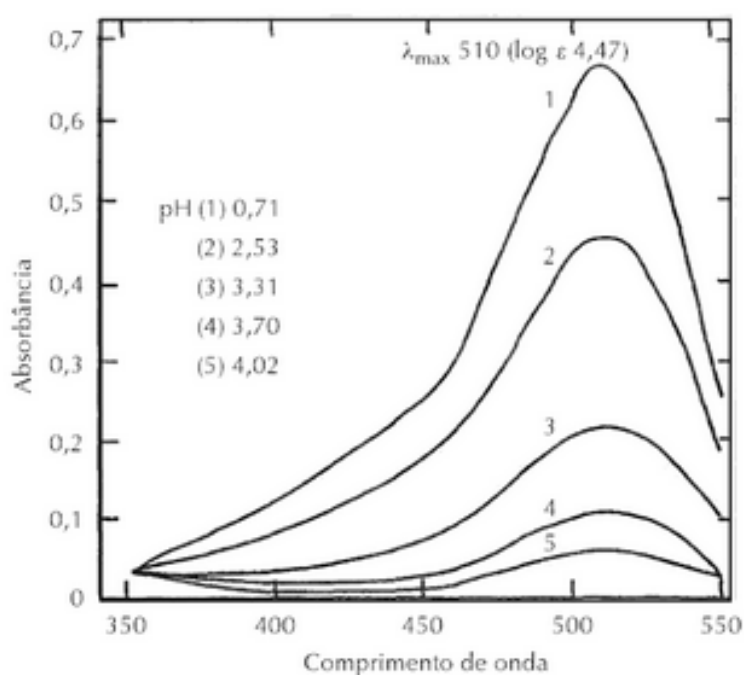
3.3 Estabilidade das Antocianinas

As antocianinas são moléculas relativamente instáveis, sua estabilidade, bem como a saturação e a tonalidade de sua cor estão fortemente relacionados com o substituinte na aglicona. A degradação de antocianinas ocorre não apenas durante a extração do tecido vegetal, mas também durante o processamento e armazenamento. Os principais fatores da degradação de antocianinas estão relacionados com a concentração de oxigênio, temperatura e o pH, sendo que em condições mais ácidas apresentam maior estabilidade. A presença de enzimas degradantes e outras moléculas, açúcares e íons metálicos assumem um papel menos importante na degradação. No geral, as estruturas que tornam as antocianinas mais estáveis junto ao pH também estão relacionadas a maior estabilidade térmica, por isso antocianidinas metiladas, glicosiladas ou aciladas são mais estáveis que as altamente hidroxilas (DAMODARAN, *et al.*, 2010).

A degradação de antocianinas geralmente inicia-se pela perda de sua coloração, seguida da manifestação da coloração amarelada e formação de produtos insolúveis (LOPES, *et al.*, 2007). O principal fator limitante no processamento e utilização de antocianinas é a sua

sensibilidade ao pH, pois afeta a sua cor e estabilidade química (LOPES, *et al.*, 2007). Alterações no pH podem ocasionar grandes mudanças nas cores, normalmente a intensidade decairá com o aumento do pH (DAMODARAN, *et al.*, 2010). A Figura 3 apresenta os espectros da antocianina cianidina-3-ramnosilglicosídeo em soluções tampões em que o pH varia de 0,71 a 4,02, nota-se que quanto menor o pH maior a absorbância. Diferente da maioria dos flavonoides que absorvem luz entre 350 e 380 nm, as antocianinas conseguem absorver fortemente na região entre 496 e 550 nm (região do visível) (TEIXEIRA, *et al.*, 2008).

Figura 3: Espectros da antocianina cianidina 3-ramnosilglicosídeo em soluções tampão de diferentes pHs. A concentração constante do pigmento: $1,6 \times 10^{-2}$ g/L.



Fonte: (FALK e PHILLIPS, 1964)

Vários compostos atuam como copigmento de antocianinas, tais como alcaloides, flavonoides, ácidos orgânicos e aminoácidos, juntos com outros compostos podem produzir um deslocamento no comprimento máximo de absorção, produzindo intensificação da cor (LOPES, *et al.*, 2007). Em meio aquosos, a instabilidade da antocianina aumenta, porém na presença desses copigmentos ocorre o aumento da estabilidade, pois o copigmento passa a competir com a água ao interagir com as antocianinas. Muitos fatores como a temperatura, luz, pH, concentração de antocianinas e de copigmento influenciam na reação de copigmentação (FALCÃO, *et al.*, 2006).

A temperatura é outro fator importante, causando degradação e alteração na qualidade de sua coloração conforme uma solução de antocianinas é submetida a temperatura maiores que

a do ambiente, 25°C, sendo mais acentuada quando se aumenta o pH do meio (LOPES, *et al.*, 2007). Sabe-se que degradação varia de acordo com o tipo de antocianina e a temperatura submetida, as antocianinas aciladas tendem a ser mais estáveis do que as não aciladas frente à degradação térmica e as antocianinas na presença de alguns metais, como alumínio e ferro, podem formar produtos insolúveis que apresentam mais estabilidade frente a degradação térmica do que as antocianinas livres (LOPES, *et al.*, 2007; FALCÃO, *et al.*, 2006). A degradação térmica de antocianinas relatada por PATRAS, *et al.* (2010) foi causada principalmente pela clivagem de ligações duplas conjugadas e/ou reações avançadas de oxidação que resultaram na formação de diferentes espécies dependentes das condições de aquecimento. Nos estudos de CRODA, *et al.* (2017) e ARROXELAS, *et al.* (2005) as antocianinas mostraram-se sensíveis ao refrigeração e armazenamento, havendo degradação de antocianinas de modo significativo, entretanto não foram apresentadas diferenças significativas na coloração.

A luz e outras formas de energia radiante também podem acelerar a degradação das antocianinas. Já em concentração elevada de açúcares as antocianinas tendem a ser mais estáveis, enquanto que em baixas concentrações, favorece a degradação da molécula. Entretanto, os açúcares presentes em sua estrutura as tornam facilmente degradáveis por microrganismos (DAMODARAN, *et al.*, 2010; ROSSI, *et al.*, 2011).

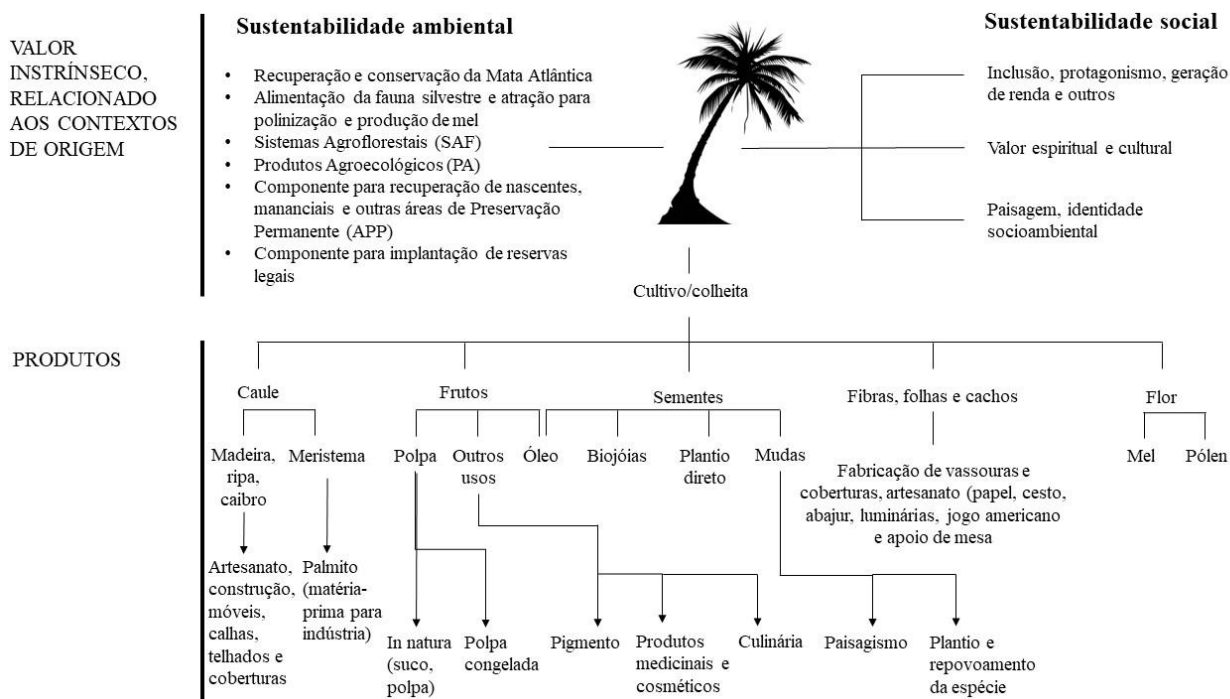
3.4 Juçara (*Euterpe edulis* Mart.)

A juçara (*Euterpe edulis* Mart.) é uma palmeira oriunda do ecossistema Mata Atlântica Brasileiro, a qual pode ser encontrada desde o norte dos Estados do Rio Grande do Sul até o sul da Bahia. Possui forte relevância no âmbito socioambiental, pois está na base alimentar de diversos animais, também é encontrada na alimentação humana e inclusive está ameaçada de extinção devido a extração ilegal por palmiteiros, visto que seu caule produz palmito de alta qualidade e elevado valor econômico. A juçara também é recorrente em muitas comunidades, sendo uma planta de múltiplas utilidades, a Figura 4 apresenta um diagrama que demonstra os inúmeros produtos oriundos da juçara, bem como seu valor econômico, social e cultural (KRUCKEN, 2009).

A definição de desenvolvimento sustentável foi reconhecida internacionalmente na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente em 1972: “O desenvolvimento que vai de encontro das necessidades atuais, sem comprometer a habilidade das futuras gerações de satisfazer suas próprias necessidades” (ONUBR, 2015). O desenvolvimento deve ser justificável do ponto de vista econômico e incontestável do ponto de vista ecológico e social

para que seja sustentável, sendo assim, imprescindível que ao considerar atividades econômicas providas de recursos naturais, as pessoas e os recursos biológicos sejam respeitados e protegidos (OECD, 2014; KRUCKEN, 2009).

Figura 4: Juçara e seus produtos e sua relação com o ecossistema e a sociedade.



Fonte: Adaptado de (KRUCKEN, 2009).

Os frutos da palmeira juçara apresentam características nutricionais e sensoriais semelhantes ao açaí (*Euterpe oleracea*), com coloração violeta intenso, característica obtida devido à alta presença de antocianinas (BRITO, *et al.*, 2007). A utilização dos frutos da juçara na alimentação humana estimula o aproveitamento sustentável desta palmeira (ROSSI, *et al.*, 2011), desta forma cria-se uma estratégia para a conservação da espécie e da Mata atlântica, além de agregar e assumir valor estratégico pois contribui para a economia destas regiões, demonstrando assim, ser um produto altamente sustentável, do qual o desenvolvimento e a promoção de novos produtos fazem-se necessário (KRUCKEN, 2009). A Figura 5 apresenta a palmeira de juçara e os seus frutos.

Figura 5: Palmeira de juçara e seus frutos.



Fonte: (IPEMA, 2015)

3.5 Extração das antocianinas

Os processos de recuperação e purificação de bioprodutos costumam ser complexos e podem representar até 80% do custo final do produto (ABRANCHES, *et al.*, 2005). Além disso as antocianinas podem degradar durante a extração, processamento e armazenamento causando impacto na qualidade de sua coloração e propriedades, sendo necessário o desenvolvimento de métodos eficazes e que permitam melhores resultados e que consigam viabilizar a sua produção em larga escala (MARTÍN, *et al.*, 2018; NAGANAGOUDA e MULINAMI, 2008).

A utilização de um solvente adequado e métodos mais eficientes de extração devem ser estudados para maximizar a concentração de antocianinas extraídas de uma matriz vegetal e para garantir a estabilidade destas substâncias (ROSSI, *et al.*, 2011). Também é necessário destacar que os métodos convencionais de extração que utilizam solventes orgânicos podem degradar e/ou inativar as antocianinas, e não devem ser utilizados no consumo humano, sem que antes sejam majoritariamente removidos, a concentração máxima destes resíduos de solventes no alimento para consumo não deve superar 10 mg de resíduo de metanol/Kg e 2 mg

de resíduo de acetona/Kg (ANVISA, 2007), o que acarreta em maiores custos e torna o processo mais complexo.

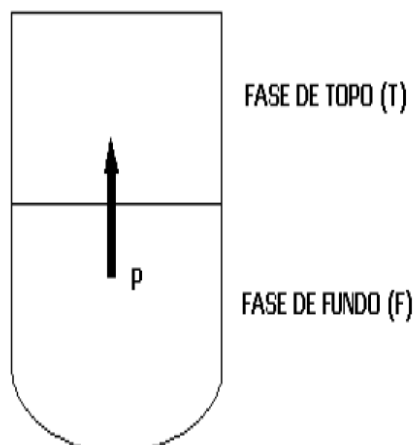
As antocianinas são moléculas polares devido à presença de agrupamentos de hidroxila e açúcares substituintes ligados aos seus anéis aromáticos. Por conseguinte, são mais solúveis em água do que em solventes apolares (BOHM, 1998; HARBORNE e GRAYER, 1988). Extratos ricos em antocianinas normalmente são extraídos com acetona, etanol, metanol e água, bem como por misturas desses solventes, uma adição de pequena porcentagem de ácido também é recomendada para prevenir a degradação de compostos não acetilados (ANUAR, *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas de extração pode-se destacar o sistema aquoso bifásico (SAB), como sendo este uma ótima alternativa devido à alta concentração de água em ambas as fases, o que simula uma estrutura favorável a estabilidade de moléculas polares, e consegue resultar em grandes rendimentos, para as antocianinas, pois evitam sua desnaturação, além de ser um processo simples e econômico (RITO-PALOMARES e BENAVIDES, 2017; SILVA, 2009). Para o desenvolvimento deste estudo, a escolha do PEG/fosfato de potássio (Polímero/sal) está relacionada ao custo do sal ser muito mais baixo e possuir alto coeficiente de partição de biomoléculas em relação a outros sais, enquanto o PEG é biodegradável e atóxico (PADILHA, *et al.*, 2011). O PEG/Fosfato costuma ser utilizado devido a diversas vantagens do processo, devido à larga faixa de pH ao qual são estáveis, curto tempo de separação e baixa viscosidade (RITO-PALOMARES e BENAVIDES, 2017; SILVA, 2009; MAYERHOFF, *et al.*, 2004).

O sistema aquoso bifásico utiliza soluções de um sal e um polímero ou de dois polímeros que possuem a capacidade de se separarem em duas fases aquosas assim que suas concentrações mínimas sejam ultrapassadas. Cada uma dessas fases é rica em um dos constituintes do sistema, formando fases aquosas distintas (SILVA, 2009; KILIKIAN e PESSOA, 2003; SARUBBO, 2000).

Na Figura 6 podemos encontrar uma representação do sistema aquoso bifásico, contendo duas fases aquosas imiscíveis, a fase de topo (T) e a de fundo (F). Os sistemas bifásicos apresentam algumas vantagens em comparação com outros métodos, são eles: (SILVA, 2009)

- Transferência de massa e o equilíbrio são atingidos rapidamente;
- Separação rápida e seletiva;
- Mais econômica se comparado a outros processos de purificação;
- Facilidade para prever “*scale-up*”;
- Existem várias substâncias que podem formar duas fases ao serem misturadas;
- Pode-se utilizar polímeros ou compostos de baixo peso molecular como os sais;

Figura 6: Representação do sistema aquoso bifásico.

Fonte: (KILIKIAN e PESSOA, 2003)

A Tabela 1 apresenta a classificação de alguns sistemas bifásicos segundo sua composição. Como apresentado, os sistemas aquosos bifásicos podem ter diversos componentes, porém os mais utilizados em extração líquido-líquido são os constituídos por Polietilenoglicol (PEG)/Sal (fosfato, sulfato, citrato) e Polietilenoglicol (PEG)/Dextrana, quando se consideram fatores importantes como a faixa de aplicação, custo, toxicidade, tempo de separação e possibilidade de reutilização dos reagentes (KILIKIAN e PESSOA, 2003; ANTELO, 2007).

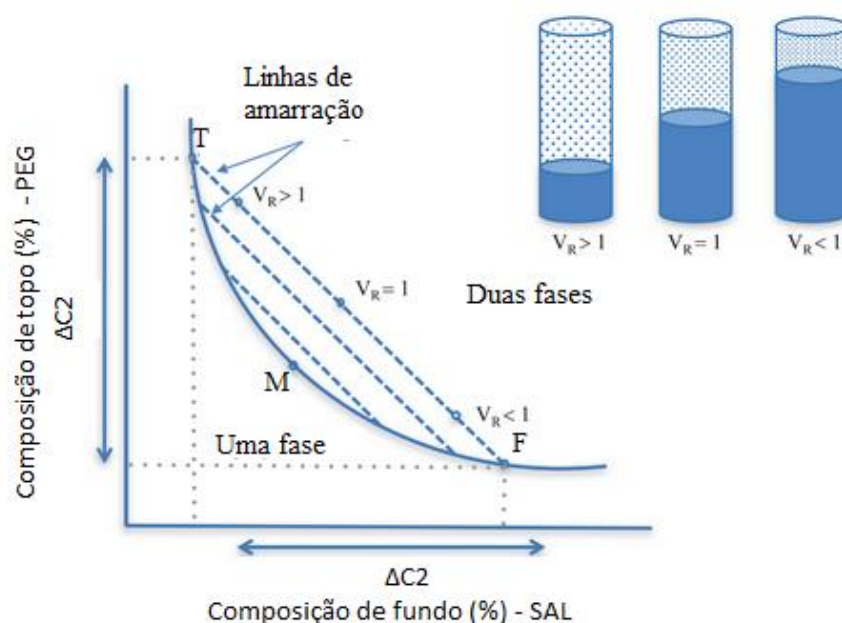
Tabela 1: Tipos de sistemas aquosos bifásicos.

Grupo:	Exemplos:
Dois polímeros não iônicos	PEG/ficoll, PEG/dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropileno glicol/dextrana, metil celulose/hidroxipropildextrana, ficoll/dextrana
Um polieletrólito e um polímero não iônico	Sulfato dextrana de sódio/polipropileno glicol, carboximetildextrana de sódio/PEG, carboximetilcelulose de sódio/metil celulose
Dois polieletrólitos	Sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carboximetildextrana de sódio/carboximetilcelulose de sódio
Um polímero não iônico e um composto de baixo peso molecular	Polipropileno glicol/fosfato de potássio, PEG/fosfato de potássio, metoxipolietileno glicol/fosfato de potássio, polipropileno glicol/glicose, PEG/glicose, PEG/sulfato de magnésio, PEG/citrato de sódio

Fonte: (SILVA, 2009)

O sistema aquoso bifásico pode ser representado por um diagrama de fases, como apresentado na Figura 7, a composição inicial do sistema é dada por M e o final de cada fase é dada por T (na fase de topo) e F (fase de fundo) após atingido o equilíbrio, o V_R representa a proporção de volume entre as fases (RITO-PALOMARES e BENAVIDES, 2017; ANTELO, 2007; KILIKIAN e PESSOA, 2003).

Figura 7: Representação de um diagrama de fases do sistema aquoso bifásico.



Fonte: Adaptado de (RITO-PALOMARES e BENAVIDES, 2017)

Um dos fatores que mais influencia o sistema aquoso bifásico é a massa molar do polímero, pois quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases, deslocando-se assim a curva binodal para esquerda. O pH também possui influência na curva binodal, pois a medida que o pH aumenta, a concentração necessária do sistema PEG/Sal diminui e consequentemente a curva desloca-se para esquerda. A concentração dos componentes do sistema também pode influenciar na densidade e na viscosidade do sistema, causando alterações nos volumes e no tempo de separação (ANTELO, 2007).

4. Material e Métodos

4.1 Amostras

Para o experimento foram obtidas polpa de juçara diretamente dos produtores da região de Ubatuba, associados ao “Projeto Juçara”, a purificação e liofilização foi realizada no laboratório de Compostos Bioativos de Alimentos da UNIFESP na baixada Santista.

4.2 Extração de antocianinas pelo método convencional

As amostras de juçara foram submetidas a extração de antocianinas utilizando metanol acidificado com 0,5% de HCl (DE ROSSO e MERCADANTE, 2007). O método consiste na adição metanol acidificado em 0,5% com HCl junto ao extrato de juçara liofilizado, seguida de agitação constante. Os extratos foram filtrados e posteriormente concentrados em evaporador rotatório ($T < 40^{\circ}\text{C}$), esta etapa foi realizada em triplicata (SILVA, *et al.*, 2014).

4.3 Extração de antocianinas utilizando sistema aquoso bifásico (SAB)

A extração de antocianinas foi realizada em SAB polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio de acordo com a correlação 0,08 g de biomassa seca/mL de água como solvente extrator estabelecida previamente. A melhor condição de extração para a formação das duas fases do sistema aquoso polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio foi selecionada (dados não apresentados – parte de um Trabalho de Conclusão de Curso em andamento), sendo esta com PEG 8000 em solução tampão de fosfato de potássio em pH 6,0 (16,79 g de fosfato de potássio monobásico e 13,03 g de fosfato de potássio dibásico e 70 g de água Milli-Q). O sistema formado com 1,9 g de PEG, 3,0 g de solução de fosfato de potássio e 5,0 g de água Milli-Q foi preparado em 20 tubos de ensaios, todos foram homogeneizados em agitação vortex. O material foi então deixado em banho de 37°C por 24 horas, posteriormente adicionou-se 0,1 g de polpa de juçara liofilizada em cada tubo de ensaio, o material foi agitado, centrifugado a 6000 rpm, e colocado em proveta, onde ficou de repouso por 10 minutos até o equilíbrio das fases, posteriormente as fases de topo contendo os extratos de antocianinas foram recolhidas.

4.4 Estudo da estabilidade térmica das antocianinas

O teor das antocianinas de juçara foi quantificado adaptando-se o método espectrofotométrico de pH diferencial descrito por TEIXEIRA, *et al.*, (2008), este método foi escolhido em contraposição ao método de pH único por ter se mostrado mais sensível e capaz de minimizar a presença de interferentes na quantificação de antocianinas. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 535 nm do extrato de

antocianinas obtidas tanto pelo método convencional quanto pelo SAB em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5, condição em que as antocianinas apresentam coloração intensa e condição em que quase não apresentam coloração, respectivamente. A diferença de absorbância das antocianinas nos diferentes pHs permitiu estimar a porção real de antocianina presente nas amostras.

O método consistiu em transferir uma alíquota de 0,5 mL do extrato de antocianina extraída pelo método aquoso bifásico para um tubo de ensaio contendo 9,5 mL de solução tampão de pH 1,0 preparado a partir da mistura de soluções de KCl (0,2 N) e HCl (0,2 N) na proporção 25/67. E uma alíquota de 1,0 mL do extrato de antocianina para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução tampão de pH 4,5, preparado a partir da solução de Acetato de Sódio (1N), HCl e água na proporção 100/60/90. O mesmo foi realizado para diversos tubos de ensaio e o mesmo método foi aplicado para o extrato obtido a partir do metanol acidificado.

Os tubos de ensaio foram colocados em banhos a temperatura constante de 50 e 90°C, as amostras foram removidas periodicamente e submetidas a análises espectrofotométricas para determinação da concentração ao longo do experimento, este processo foi realizado até que metade da concentração inicial das amostras fosse atingida, a fim de avaliar suas propriedades em termos de meia vida ($t_{1/2}$). Com base na concentração foi possível determinar os parâmetros de desnaturação térmica para cada extrato (convencional e SAB) (BRAGA, *et al.*, 2016).

A porção real das antocianinas de juçara presente nas amostras foi quantificado pelo método de pH diferencial, a partir da diferença de absorbância das amostras em tampão pH 1,0 e 4,5 a partir da Equação 1:

$$C = \frac{\Delta_{abs} V_{final}}{\epsilon L V_{amostra}} V_{fase} \times 1000 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: C_F : Concentração de antocianinas (mg/mL amostra);

Δ_{abs} : Diferença entre absorbância da amostra em pH 1,0 e 4,5 (nm);

V_{final} : Volume final da amostra (mL);

ϵ : Coeficiente de extinção da cianidina 3-glucosídeo: 26,9;

L : Distância percorrida pela luz no espectrofotômetro 1cm;

$V_{amostra}$: Volume da amostra (mL);

V_{fase} : Volume da fase de topo (mL);

1000: Fator de conversão do ϵ ;

A constante de desnaturação térmica k_d foi estimada pela regressão dos dados experimentais obtidos em relação ao tempo. Assumindo uma reação cinética de primeira ordem, K_d foi estimado de acordo com a Equação 2 (ANTELO, 2007):

$$\frac{dC}{dt} = -K_d C \quad \text{Equação 2}$$

Onde: C: Concentração de antocianinas (mg/mL)

t: Tempo (s)

K_d : Constante de desnaturação térmica.

A Equação 2 pode ser integrada, obtendo-se a Equação 3:

Equação 3

$$\ln\left(\frac{C_F}{C_0}\right) = -K_d t$$

Onde: C_F : Concentração de antocianinas final (mg/mL)

C_0 : Concentração de antocianinas inicial (mg/mL)

t: Tempo (s)

K_d : Constante de desnaturação térmica.

Ao isolar o tempo na Equação 3, podemos encontrar os valores de meia-vida $t_{1/2}$, o tempo para que a concentração de antocianinas inicial caia para metade, tomando-se $\left(\frac{C_F}{C_0}\right) = 0,5$ podem ser obtidos através foi obtida através da Equação 4:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_d} \quad \text{Equação 4}$$

A equação de Arrhenius relaciona a temperatura com a constante para a velocidade de reações elementares e permite a determinação da energia de ativação da reação de desnaturação, através da Equação 5:

$$K_d = Ae^{-E_d/RT} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

K_d : Constante de degradação térmica (s^{-1});

A: Fator de frequência (s^{-1});

E_d : Energia de ativação da reação de degradação (kJ/mol);

T: Temperatura (K);

R: Constante dos gases (J/mol/K);

O fator de frequência (A), fornece a frequência com a qual a reação ocorre, enquanto E_d está relacionado com a energia requerida para ultrapassar a barreira energética para degradar as antocianinas.

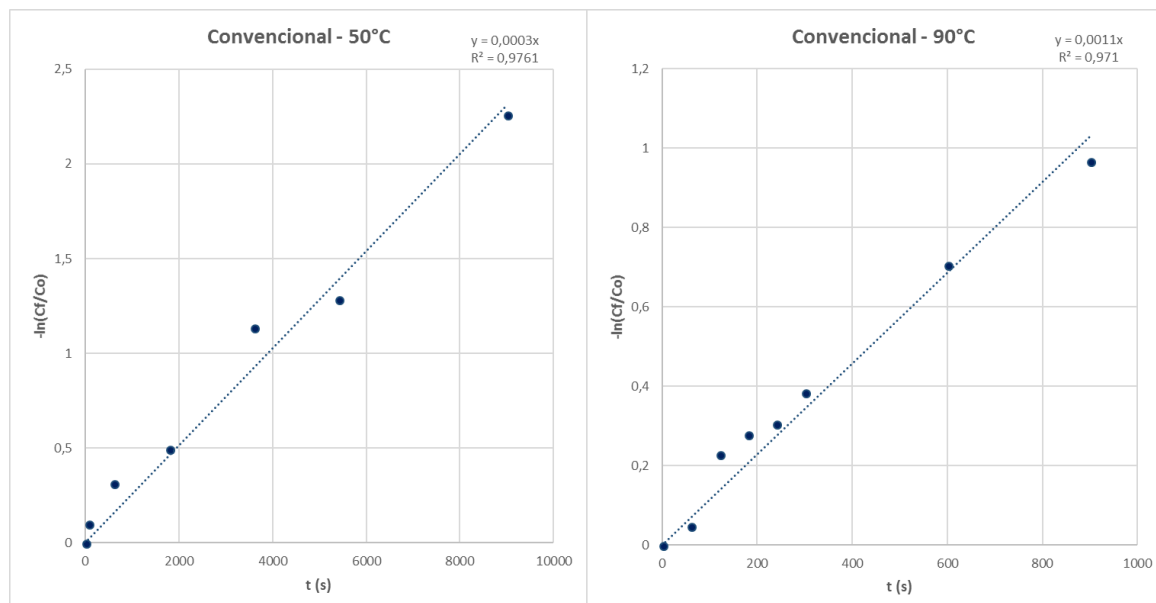
5. Resultados e Discussão

As antocianinas de juçara extraídas pelo método convencional, utilizando metanol acidificado, foram submetidas a um banho de temperatura de 50 e 90 °C, amostras foram retiradas e analisadas de acordo com o tempo, a quantificação de antocianinas foi realizada pelo método de pH diferencial a partir da Equação 1, o que permitiu a determinação da constante de desnaturação térmica (K_d) para cada temperatura pela regressão dos dados experimentais em função do tempo, relação apresentada pela Equação 3. A Tabela 2 e a Figura 8 apresentam os dados para o sistema convencional.

Tabela 2: Dados experimentais para o sistema convencional (metanol acidificado).

Sistema Convencional					
T (°C)	t (s)	Δabs (535 nm)	[Antoc] (mg/mL)	K_d (s ⁻¹)	R ²
50	0	0,0987	366,9	0,0003	0,9761
	60	0,0891	331,2		
	600	0,0719	267,3		
	1800	0,0600	223,0		
	3600	0,0316	117,5		
	5400	0,0273	101,5		
	9000	0,0103	38,3		
90	0	0,163	605,9	0,0011	0,9710
	60	0,161	577,5		
	120	0,130	481,4		
	180	0,123	458,0		
	240	0,120	446,1		
	300	0,111	412,3		
	600	0,080	298,9		
	900	0,070	230,2		

Figura 8: Determinação do K_d a partir da regressão dos dados experimentais em relação ao t (s) para o sistema convencional (metanol acidificado).

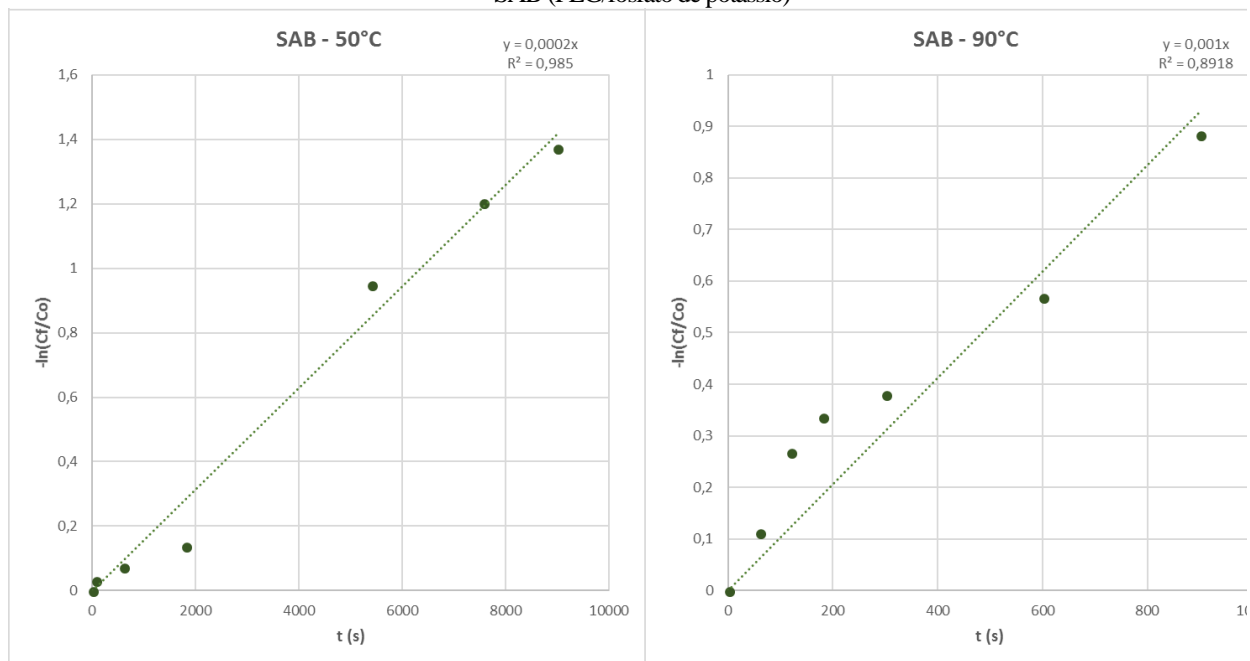


Da mesma forma, as antocianinas de juçara foram extraídas por um sistema aquoso bifásico – SAB (PEG/fosfato de potássio) e foram avaliadas quanto à sua estabilidade térmica em duas temperaturas, os dados relacionados à extração com SAB estão apresentados Tabela 3 e Figura 9.

Tabela 3: Dados experimentais SAB (PEG/fosfato de potássio).

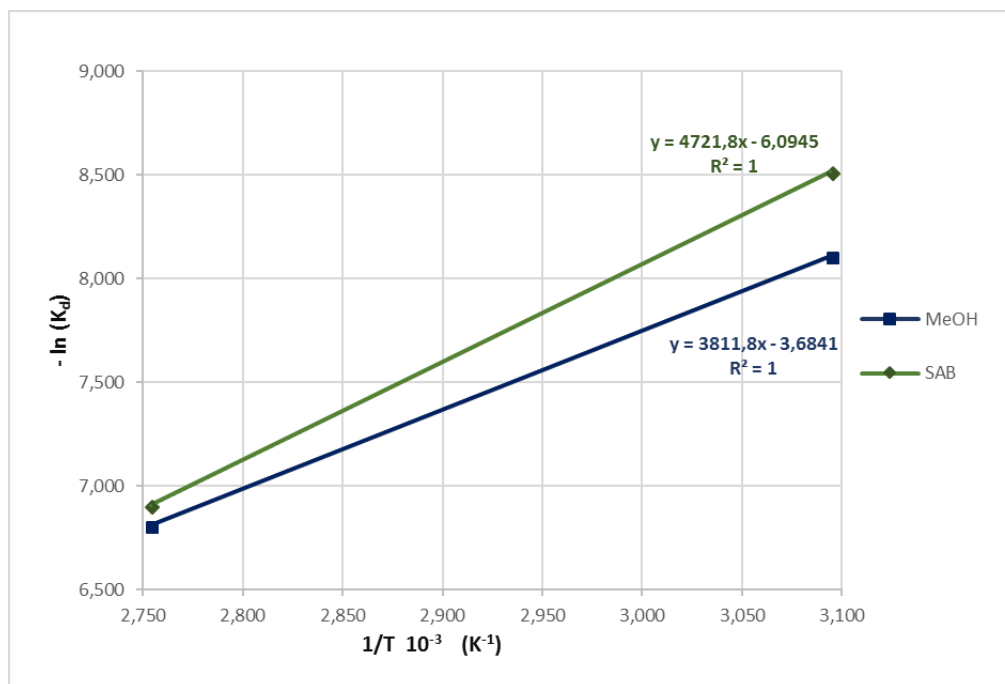
Resultados para o Sistema Aquoso Bifásico (SAB)					
T (°C)	t (s)	Δ_{abs} (535 nm)	[Antoc] (mg/mL)	K_d (s ⁻¹)	R ²
50	0	0,2582	575,9	0,0002	0,9850
	60	0,2500	557,6		
	600	0,2400	535,3		
	1800	0,2245	500,7		
	5400	0,0999	222,8		
	7560	0,0775	172,8		
	9000	0,0654	145,9		
90	0	0,146	652,7	0,001	0,8918
	60	0,131	583,5		
	120	0,112	498,6		
	180	0,104	465,9		
	300	0,100	445,9		
	600	0,083	369,2		
	900	0,060	269,7		

Figura 9: Determinação do K_d a partir da regressão dos dados experimentais em relação ao t (s) para o sistema aquoso bifásico - SAB (PEG/fosfato de potássio)



Verificou-se que a degradação das antocianinas, seguiu o modelo de cinética de primeira ordem (Equação 2), como revelado pelas correlações (R^2) entre 0,8918 e 0,985 obtidos para a determinação da constante de degradação. Como é possível observar pelos resultados apresentados na Tabela 2 e 3, o método de extração utilizando SAB foi capaz de extrair um teor maior de antocianinas de juçara do que o método convencional utilizando metanol acidificado. Avaliando ambos os métodos, a degradação das antocianinas ocorreu de forma mais acelerada para a temperatura de 90°C do que para de 50°C como esperado, pois, as antocianinas são mais facilmente degradadas com o aumento da temperatura.

Após definir as constantes de degradação (K_d) e com o auxílio da Equação 4, foi possível obter a meia vida ($t_{1/2}$), enquanto a energia de ativação da reação de degradação (E_d) e o fator de frequência (A) foram obtidas pela linearização da Equação 5 (Figura 10). Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Figura 10: Linearização equação de Arrhenius para obtenção de E_d e A ;**Tabela 4:** Resultados dos parâmetros de degradação térmica para o método convencional (metanol acidificado) e SAB (PEG/fosfato de potássio).

Método:	T (°C)	1/T (K ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	t _{1/2} (s)	A (s ⁻¹)	E _d (kJ/mol)
Convencional	50	3,095	0,0003	2310,5	0,0251	32,0
	90	2,754	0,0011	630,1		
SAB	50	3,095	0,0002	3465,7	0,0023	39,3
	90	2,754	0,0010	693,1		

Nota-se que a constante de desnaturação térmica (K_d) é inversamente proporcional a estabilidade da antocianina, portanto quanto maior o valor de K_d menor é a estabilidade da antocianina. O SAB apresentou menores valores de K_d , 0,0002 e 0,0010 s⁻¹ para as temperaturas de 50 e 90°C respectivamente, em comparação com o método convencional que apresentou valores de 0,0003 e 0,0011 s⁻¹.

O tempo de meia vida também é mais elevado para o SAB nas duas temperaturas do que para o método convencional, o que confirma que quanto mais demorado o decaimento da concentração, mais estável a antocianina.

Observa-se que o valor de R^2 foi igual 1 o que demonstra que a linearização da equação de Arrhenius foi bem aceita para os dois métodos. A energia de degradação (E_d) obtida para o método convencional foi de 31,961 kJ/mol, cerca de 18,6% menor que a obtida para o

SAB com $E_d = 39,257$ kJ/mol, demonstrando que a energia requerida para ultrapassar a barreira energética para degradar a antocianina é muito maior para as antocianinas extraídas pelo SAB. O fator de frequência para o SAB também é menor, revelando que a ocorrência desta reação é inferior.

É imperativo conhecer o comportamento térmico dos compostos para melhorar seu uso dirigido. A partir dos dados obtidos no presente trabalho, as alterações das antocianinas mostraram um comportamento de degradação linear em ambos os métodos de extração. Diversas aplicações industriais envolvem aquecimento térmico e, como, pigmentos termicamente mais estáveis são extremamente desejáveis para aplicações práticas, o que, portanto, justifica o uso de SABs para extrair as antocianinas dos frutos e de outra matriz alimentar. Como por exemplo produtos que necessitam passar pelo processo de pasteurização, onde ocorre o aquecimento a temperaturas brandas (abaixo de 100°C) durante alguns segundos, como a meia vida das antocianinas obtidas pelos dois métodos leva a ordem de minutos até que o ocorra a queda da sua concentração inicial, seu uso pode ser aplicado.

6. Conclusões

Utilizando os parâmetros obtidos pela análise experimental para as antocianinas de juçara extraídas pelo método convencional (metanol acidificado) e pelo sistema aquoso bifásico - SAB (PEG/fosfato de potássio), foi confirmado que as antocianinas são mais facilmente degradadas com a intensificação e maior tempo de exposição à temperatura. Também foi possível constatar que a extração de antocianinas realizada pelo sistema aquoso bifásico, além de fornecer um maior teor de antocianinas do que o método convencional, também foi capaz de gerar moléculas de melhor qualidade frente à desnaturação térmica, visto que a energia de degradação (E_d) obtida foi aproximadamente 18,6% maior ($E_d = 39,3$ kJ/mol) que a energia de degradação do método convencional (32,0 kJ/mol), revelando antocianinas com estabilidade térmica superior as antocianinas extraídas por um solvente orgânico (método convencional), por conseguinte, o sistema aquoso bifásico apresenta-se como uma boa alternativa para a extração de antocianinas, em razão ao seu baixo custo e biodegradabilidade frente aos métodos convencionais. Seu uso também pode ser justificado devido aos diversos processos na indústria que utilizam aquecimento térmico e os quais necessitam de pigmentos termicamente mais estáveis, no entanto, apenas a compreensão do efeito da temperatura no comportamento dessas moléculas junto aos processos aos quais elas serão utilizadas permitirá seu uso de forma mais efetiva, sem que haja a perda de sua integridade.

7. Referências

- ABRANCHES, R. et al. Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. **Journal of Biotechnology**, 120, n. 1, 17 Oct 2005. 121-134.
- ANTELO, F. **PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* ATRAVÉS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA DESNATURAÇÃO TERMICA**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 2007. (Dissertação Mestrado Engenharia e Ciência de Alimentos).
- ANUAR, N. et al. **Optimization of extraction parameters by using response surface methodology, and identification of anthocyanin pigments in *Melastoma malabathricum* fruit**. [S.l.]: The Scientific world journal, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794562/#B1>>. Acesso em: 15 maio 2018.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 2**. [S.l.], p. 1-19. 2007.
- ARROXELAS, V. L. et al. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 25, n. 1, Jan./Mar. 2005.
- BASHARAT, Y. et al. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. **Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56, 2016. 2223-2230.
- BELL, L. et al. A Review of the Cognitive Effects Observed in Humans Following Acute Supplementation with Flavonoids, and Their Associated Mechanisms of Action. **Nutrients**, v. 7, p. 7(12), 2015. ISSN 10290-10306.
- BOHM, B. A. **Introduction to Flavonoids**. [S.l.]: Harwood Academic Publishers, 1998.
- BRAGA, A. R. C. . M. D. C. . M. L. M. S. . D. R. V. V. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2018. 31-40.
- BRAGA, A. R. C. et al. IMPROVEMENT OF THERMAL STABILITY OF C-PHYCOCYANIN BY NANOFIBER AND PRESERVATIVE AGENTS. **Journal of Food Processing and Preservation ISSN 1745-4549**, n. Wiley Periodicals, 2016.
- BRITO, E. S. et al. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara and Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 2007. 9389-9394. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0715020>>.
- CRODA, M. F. et al. Bioactive compounds in a mixed juice of *Euterpes edulis* and *Bunchosia glandulifera*. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 20, 2017. ISSN 1981-6723.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. [S.l.]: artmed, 2010.

DE ROSSO, V. V. . M. A. Z. The high ascorbic acid content is the main cause of low anthocyanin stability in acerola. **Journal J. Agric. Food Chem.**, 2007. 103.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007. 55.

FALCÃO, L. D. et al. COPIGMENTAÇÃO INTRA E INTERMOLECULAR DE ANTOCIANINAS: UMA REVISÃO. **B.CEPPA**, Curitiba, Jul-Dez 2006. 351-366.

FALK, J. E.; PHILLIPS, J. N. **Chelating Agents and Metal Chelates**. New York: Academic Press, 1964. 441-490 p.

FAMAGUSTA & GAZI UNIVERSITY ANKARA TURKEY. **Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites**. [S.l.]: Bentham e Books, 2012.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, Santa Fe, 2012.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J. **The flavonoids**: advances in research since 1980. London: Chapman & Hall, 1988. 1-20 p.

HE, J.; GIUSTI, M. M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables--a novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A.**, 4 Nov 2011.

INAURY, S. **SUPERFRUTAS, Anuário Brasileiro**. Sobradinho-DF: Nossa Gráfica, 2016. 120 p.

IPEMA. Projeto Juçara. **Ipema Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://ipemabrasil.org.br/projetos/>>. Acesso em: 03 maio 2018.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal Um Enfoque Filogenético**. São Paulo: artmed, 2009. 96 p.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA, J. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2003.

KRUCKEN, L. **Design e território valorização de identidades e produtos locais**. [S.l.]: Studio Nobel, 2009. p. 75-79 p.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, p. 18-22, 2000.

LOPES, T. J. et al. ANTOCIANINAS: UMA BREVE REVISÃO DAS CARACTERÍSTICAS. **R. Bras. Agrocência**, Pelotas, v. 13, n. 3, p. 291-297, set 2007.

MARTÍN, J.; MONTAÑA, E. J. D.; ASUERO, A. G. Recovery of Anthocyanins Using Membrane Technologies: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 143-175, 2018. ISSN DOI: 10.1080/10408347.2017.1411249.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Purification of Xylose Reductase from Candida Mogii in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, 2004. 217-223.

MCANULTY, L. S. et al. Bioactive Properties and Potential Health Benefits of Blueberries and Anthocyanins. **Medical Research Archives**, 5, n. 2, 2 Feb 2017. Disponível em: <<https://journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/985>>. Acesso em: 05 setembro 2018.

NAGANAGOUDA, K.; MULINAMI, V. H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillusoryzae*-galactosidase. **Process Biochemistry**, 43, 2008.

OECO. O que é Desenvolvimento Sustentável. Dicionário Ambiental. **oeco**, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.oeco.org.br/dicionario-ambiental/28588-o-que-e-desenvolvimento-sustentavel>>. Acesso em: 15 maio 2018.

ONUBR. A ONU e o meio ambiente. **ONUBR Nações Unidas no Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://nacoesunidas.org/acao/meio-ambiente>>. Acesso em: 15 maio 2018.

PADILHA, G. S. et al. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. **Food Science and Technology**, Campinas, Jan./Mar. 2011.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, 21, 2010. 3-11.

PENNINGTON, B. R. C. Pennington Nutrition Series. **PBRC**, 29 abr. 2009. Disponível em: <http://www.pbrc.edu/training-and-education/pdf/pns/pns_anthocyanins.pdf>. Acesso em: 15 maio 2018.

RITO-PALOMARES, M.; BENAVIDES, J. **Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products**. [S.l.]: Springer International Publishing AG, v. 1, 2017.

ROSSI, A. V. et al. Antocianinas: corantes naturais para alimentos, cosméticos, tintas e experiências para ensinar e aprender Química. **Canal Ciencia**, 14 outubro 2011. Disponível em: <<http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0244-Antocianinas-quimica-corantes-naturais.html>>. Acesso em: 01 maio 2018.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um Novo Sistema Bifásico Aquoso e Aplicação em Extração de Proteínas com Coluna de Discos Perfurados Rotativos**. Universidade Estadual de Campinas. [S.l.]. 2000. (Tese Doutorado em Engenharia Química).

SILVA, A. P. R. **Purificação de B-galactosidade de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas**. Universidade Federal do Rio Grande. [S.l.]. 2009. (Dissertação Título Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).

SILVA, M. C. H. et al. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons, Viçosa, 2006.

SILVA, N. A. et al. Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014. 62(22).

SOUZA, A. C. P. **Caracterização e estabilidade de micropartículas de antocianinas extraídas do bagaço da produção do suco de jabuticaba**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Porto Alegre. 2014.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Ceres**, p. 297-304, 2008. ISSN 0034-737X.

TENANGO, M. P.; HERNÁNDEZ, M. S.; HERNÁNDES, E. A. Flavonoids in Agriculture. In: JUSTINO, G. C. **Flavonoids**. [S.l.]: [s.n.], 2017. Cap. Chapter 10. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/flavonoids-in-agriculture>>.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, 59, 2004. 113–122.

YOUSUF, B. et al. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. **A Review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56, 2016. 2223-2230.